

FILED 2-1-02

## Phosphonic acid derivatives, production and use thereof.

Patent Number: ☐ EP0518299, A3, B1  
Publication date: 1992-12-16  
Inventor(s): KAWADA AKIRA (JP); MORI MASAOKI (JP); WAKIMASU MITSUHIRO (JP)  
Applicant(s): TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD (JP)  
Requested Patent: ☐ JP5105698  
Application: EP19920109769 19920610  
Priority Number(s): JP19920089111 19920409; JP19910142099 19910613  
IPC Classification: A61K37/64 ; C07K5/06  
EC Classification: C07K5/06P  
Equivalents: CA2071106, DE69222570D, DE69222570T, ☐ US5330978

### Abstract

A phosphonic acid derivative compound represented by formula [I] or a pharmaceutically acceptable salt thereof: wherein R1, R2 and R3 each represent hydrocarbon groups which may be substituted, except cases in which (1) R2 is unsubstituted methyl, (2) R3 is an unsubstituted hydrocarbon group having 1 to 3 carbon atoms, and (3) R1 is benzyloxycarbonylaminoethyl, R2 is isobutyl and R3 is isobutyl or phenylmethyl, which has endothelin-converting enzyme inhibiting activity and is useful as pharmaceutical drugs such as therapeutic agents for hypertension, cardiac or cerebral circulatory diseases and renal diseases.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-105698

(43)公開日 平成5年(1993)4月27日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 5/06	Z	8318-4H		
A 6 1 K 37/02	A B U	8314-4C		
37/64	A B N	8314-4C		
	A C V			
C 0 7 K 1/06				

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 14 頁)

(21)出願番号	特願平4-89111	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成4年(1992)4月9日	(72)発明者	脇舩 光廣 茨城県つくば市大字下広岡433番地の12
(31)優先権主張番号	特願平3-142099	(72)発明者	森 正明 茨城県つくば市並木3丁目17番地の1 ロ イヤルコーポヨコタ102号
(32)優先日	平3(1991)6月13日	(72)発明者	河田 彰 茨城県土浦市乙戸南1丁目4番10号
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 岩田 弘 (外5名)

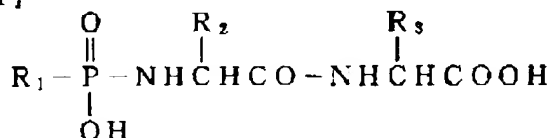
(54)【発明の名称】 ホスホン酸誘導体、その製造法および用途

(57)【要約】

【目的】新規なエンドセリン変換酵素阻害作用を有する化合物の創製。

【構成】式

【化1】



〔式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はそれぞれ、置換されていてもよい炭化水素基を示す。ただし、①R<sub>2</sub>が無置換のメチル基である場合、②R<sub>3</sub>が炭素数1～3の無置換の炭化水素基である場合、および、③R<sub>1</sub>がベンジルオキシカルボニルアミノメチル基でR<sub>2</sub>がイソブチル基であってR<sub>3</sub>がイソブチル基もしくはフェニルメチル基である場合を除く。〕で表されるホスホン酸誘導体またはその塩。

【効果】高血圧治療剤、心・脳循環疾患治療剤、腎疾患治療剤等の医薬として有用。

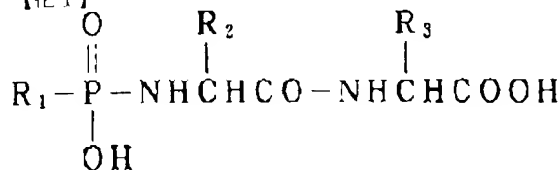
(2)

特開平5-105698

【特許請求の範囲】

【請求項1】式

【化1】



【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はそれぞれ、置換されていてもよい炭化水素基を示す。ただし、①R<sub>2</sub>が無置換のメチル基である場合、②R<sub>3</sub>が炭素数1～3の無置換の炭化水素基である場合、および、③R<sub>1</sub>がベンジルオキシカルボニルアミノメチル基でR<sub>2</sub>がイソブチル基であってR<sub>3</sub>がイソブチル基もしくはフェニルメチル基である場合を除く。】で表されるホスホン酸誘導体またはその塩。

【請求項2】R<sub>1</sub>が炭素数1～12のアルキル基、5～7員環の脂環状アルキル基、または炭素数6～12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1～5のアルキル基である請求項1記載のホスホン酸誘導体。

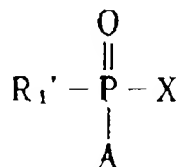
【請求項3】R<sub>2</sub>が炭素数1～8のアルキル基、5～7員環の脂環状アルキル基、または炭素数6～12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1～5のアルキル基である請求項1記載のホスホン酸誘導体。

【請求項4】R<sub>3</sub>が炭素数1～8のアルキル基である請求項1記載のホスホン酸誘導体。

【請求項5】R<sub>1</sub>が炭素数1～12のアルキル基、5～7員環の脂環状アルキル基、または炭素数6～12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1～5のアルキル基、R<sub>2</sub>が炭素数1～8のアルキル基、5～7員環の脂環状アルキル基、または炭素数6～12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1～5のアルキル基で、かつ、R<sub>3</sub>が炭素数1～8のアルキル基である請求項1記載のホスホン酸誘導体。

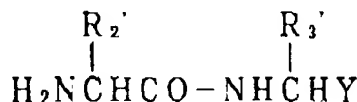
【請求項6】式

【化2】



で表される有機リン化合物と式

【化3】



で表されるジペプチド化合物またはその塩【両式中、Aは保護されたヒドロキシ基を、Xはハロゲン原子を、Yは保護されたカルボキシ基を、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'およびR<sub>3</sub>'はそれぞれ、置換されていてもよい炭化水素基を示し、

該炭化水素基に保護する必要な基がある場合は保護基で保護されている。ただし、①R<sub>2</sub>'が無置換のメチル基である場合、②R<sub>3</sub>'が炭素数1～3の無置換の炭化水素基である場合、および、③R<sub>1</sub>'がベンジルオキシカルボニルアミノメチル基でR<sub>2</sub>'がイソブチル基であってR<sub>3</sub>'がイソブチル基もしくはフェニルメチル基である場合を除く。】とを反応させ、要すれば、保護基除去処理を行うことを特徴とする請求項1記載のホスホン酸誘導体またはその塩の製造法。

【請求項7】請求項1記載のホスホン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を含有する医薬組成物。

【請求項8】エンドセリン変換酵素阻害剤である請求項7記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はエンドセリン変換酵素阻害作用を有する新規なホスホン酸誘導体、その製造法および用途に関する。

【0002】

【従来の技術】エンドセリンは柳沢らによりブタ大動脈内皮細胞の培養上清から単離、構造決定された21個のアミノ酸からなる血管収縮性ペプチドである（柳沢ら、ネイチャー(Nature), 332巻, 411-415頁(1988年)）。エンドセリンをコードしている遺伝子の研究からエンドセリンの生合成機構として、エンドセリン前駆体からビッグエンドセリンを経て生合成される機構が推定され（上記論文参照）、その後の研究からビッグエンドセリンをエンドセリンに変換する酵素（エンドセリン変換酵素）の存在が明かにされている（池川ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 171巻, 669-675頁(1990年)；岡田ら、同, 171巻, 1192-1198頁(1990年)）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】エンドセリンは血圧上昇作用を有していることから循環系調節に関与する内因性因子であることが予想され、高血圧症、心・脳循環疾患、腎疾患との関係が推定されている。従って、エンドセリン変換酵素の阻害剤を得ることができればこれらの疾患の有効な治療薬になる可能性が大きい。現時点ではエンドセリン変換酵素阻害物質としてホスホラミドン以外は報告されていない。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究を行った結果、エンドセリン変換酵素阻害作用を有する本発明の新規化合物を創製した。すなわち本発明は、式

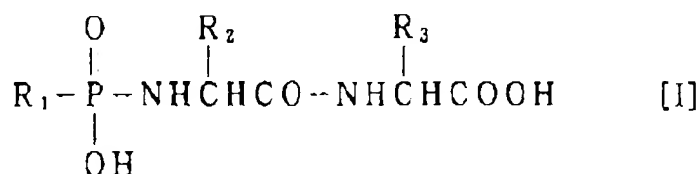
【I】

【0005】

【化4】

(3)

特開平5-105698



【0006】〔式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はそれぞれ、置換されていてもよい炭化水素基を示す。ただし、①R<sub>2</sub>が無置換のメチル基である場合、②R<sub>3</sub>が炭素数1～3の無置換の炭化水素基である場合、および、③R<sub>1</sub>がベンジルオキシカルボニルアミノメチル基でR<sub>2</sub>がイソブチル基であってR<sub>3</sub>がイソブチル基もしくはフェニルメチル基である場合を除く。〕で表されるホスホン酸誘導体およびその塩、ならびにそれらの製造法・用途に関する。

【0007】本明細書においてアミノ酸およびペプチドなどを略号で表示する場合、それらはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。

【0008】Val : バリン

Nva : ノルバリン

Leu : ロイシン

Ile : イソロイシン

Nle : ノルロイシン

Met : メチオニン

Cha : シクロヘキシルアラニン

Phe : フェニルアラニン

Trp : トリプトファン

また本明細書中で常用される保護基および試薬を下記の記号で表記する。

【0009】

Boc : tert-ブトキシカルボニル

Bzl : ベンジル

HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミド

DCC : N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

DCHA : N,N'-ジシクロヘキシルアミン

本発明の化合物〔I〕においてR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はそれぞれ、置換されていてもよい炭化水素基（ただし、①R<sub>2</sub>が無置換のメチル基である場合、②R<sub>3</sub>が炭素数1～3の無置換の炭化水素基である場合、および、③R<sub>1</sub>がベンジルオキシカルボニルアミノメチル基でR<sub>2</sub>がイソブチル基であってR<sub>3</sub>がイソブチル基もしくはフェニルメチル基である場合を除く）を示す。

【0010】上記R<sub>1</sub>の炭化水素基としてはアルキル基、シクロアルキル基、またはアラルキル基が好ましい。アルキル基としては直鎖状または分枝状の炭素数1～12のアルキル基が好ましく、たとえば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イ

ソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソアミル、tert-アミル、n-ヘキシル、n-オクチル、n-デシル、n-ドデシルなどがあげられる。これらのアルキル基は置換されていてもよく、該置換基としてはシクロアルキル（たとえば、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなど）、ハロゲン（たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど）、ヒドロキシ（保護されていてもよい）、アルコキシ（たとえば、メトキシ、エトキシなど）、ケトン、アミノ（保護されていてもよい）、置換アミノ（保護されていてもよい）があげられる。置換されたアルキル基としてはたとえば、シクロヘキシルメチル、2-シクロヘキシルエチル、2-フルオロエチル、2-クロロエチル、3-クロロプロピル、2-ヒドロキシエチル、2-メトキシエチル、2-アミノエチルなどがあげられる。シクロアルキル基としては5～7員環の脂環状アルキル基が好ましく、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルがあげられる。これらのシクロアルキル基は置換されていてもよく、該置換基としては低級アルキル（たとえば、メチル、エチル、n-プロピルなど）、ハロゲン（たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど）、ヒドロキシ（保護されていてもよい）、アルコキシ（たとえば、メトキシ、エトキシなど）、ケトン、アミノ（保護されていてもよい）、置換アミノ（保護されていてもよい）があげられる。置換されたシクロアルキル基としてはたとえば、4-メチルシクロヘキシル、4-クロロシクロヘキシル、4-ヒドロキシシクロヘキシル、4-メトキシシクロヘキシルなどがあげられる。アラルキル基としては炭素数6～12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1～5のアルキル基が好ましく、たとえば、フェニルメチル（=ベンジル）、2-フェニルエチル（=フェネチル）、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2-（1-ナフチル）エチル、2-（2-ナフチル）エチル、3-フェニルプロピルなどがあげられる。これらのアラルキル基は置換されていてもよく、該置換基としては低級アルキル（たとえば、メチル、エチル、n-プロピルなど）、シクロアルキル（たとえば、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）、ハロゲン（たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど）、ヒドロキシ（置換されていてもよい）、アルコキシ（たとえば、メトキシ、エトキシなど）があげられる。置換されたアラルキル基としてはたとえば、4-メチルフェニルメチル、2-（4-メチルフェニル）エチル、4-フルオロフェニルメチル、2-（4-クロロフェニル）エチル、2-（4-メトキシ

(4)

特開平5-105698

フェニル) エチルなどがあげられる。R<sub>1</sub>としてはイソアミル、シクロヘキシルメチル、2-フェニルエチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2-(1-ナフチル)エチル、2-(2-ナフチル)エチルが好ましい。

【0011】上記R<sub>2</sub>の炭化水素基としてはアルキル基、シクロアルキル基、またはアラルキル基が好ましい。アルキル基としては直鎖状または分枝状の炭素数1~8のアルキル基が好ましく、たとえば、メチル(無置換のメチルは除く)、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソアミル、tert-アミル、n-ヘキシル、n-オクチルなどがあげられる。これらの低級アルキル基は置換されていてもよく、該置換基としてはシクロアルキル(たとえば、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなど)、ハロゲン(たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど)、ヒドロキシ(保護されていてもよい)、メルカプト(保護されていてもよい)、アルコキシ(たとえば、メトキシ、エトキシなど)、アルキルチオ(たとえば、メチルチオ、エチルチオなど)、アミノ(保護されていてもよい)、置換アミノ(保護されていてもよい)、グアニジノ(保護されていてもよい)、カルボキシル(保護されていてもよい)、カルバモイル、ケトン、複素環基(炭素以外の環構成原子として窒素および/または酸素および/または硫黄を1~3個含む1~3環性の縮合複素環の炭素に結合した水素を取り除いてできる基。たとえば、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリダジニル、3-フリル、3-チエニル、2-インドリル、3-インドリル、4-チアゾリル、4-イミダゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニルなど)があげられる。置換された低級アルキル基としてはたとえば、シクロヘキシルメチル、2-シクロヘキシルエチル、2-フルオロエチル、2-クロロエチル、3-クロロプロピル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、2-メトキシエチル、2-アミノエチル、4-アミノブチル、3-グアニジノプロピル、カルバモイルメチル、2-カルバモイルエチル、メルカプトメチル、カルボキシメチル、2-カルボキシエチル、4-イミダゾリルメチル、3-インドリルメチルなどがあげられる。シクロアルキル基としては5~7員環の脂環状アルキル基が好ましく、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルがあげられる。これらのシクロアルキル基は置換されていてもよく、該置換基としては低級アルキル(たとえば、メチル、エチル、n-プロピルなど)、ハロゲン(たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど)、ヒドロキシ(保護されていてもよい)、アルコキシ(たとえば、メトキシ、エトキシなど)があげられる。置換されたシクロアルキル基としては、たとえば、4-メチルシクロヘキシル、4-クロロシクロヘキシル、4-ヒドロキシシクロヘキシル、4-メトキシシクロヘキシルなどがあげられる。アラルキル基としては炭素数6~12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1~5のアルキル基が好ましく、たとえば、フェニルメチル、1-ナフチルメチル、2-フェニルエチル、2-ナフチルメチル、2-(1-ナフチル)エチル、2-(2-ナフチル)エチル、3-フェニルプロピルなどがあげられる。これらのアラルキル基は置換されていてもよく、該置換基としては低級アルキル(たとえば、メチル、エチル、n-プロピルなど)、シクロアルキル(たとえば、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなど)、ハロゲン(たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど)、ヒドロキシ(保護されていてもよい)、アルコキシ(たとえば、メトキシ、エトキシなど)があげられる。置換されたアラルキル基としてはたとえば、4-メチルフェニルメチル、2-(4-メチルフェニル)エチル、4-フルオロフェニルメチル、2-(4-クロロフェニル)エチル、2-(4-メトキシフェニル)エチルなどがあげられる。R<sub>2</sub>としてはn-プロピル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシルメチル、ペンジルが好ましく、とりわけ、イソブチルが特に好ましい。

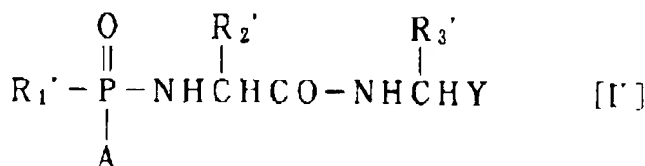
【0012】上記R<sub>3</sub>の炭化水素基としてはアルキル基、シクロアルキル基またはアラルキル基が好ましい。アルキル基としては直鎖状または分枝状の炭素数4~8の無置換のアルキル基または炭素数1~8の置換されたアルキル基が好ましい。炭素数4~8の無置換のアルキル基としては、たとえば、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソアミル、tert-アミル、n-ヘキシル、イソヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなどがあげられる。炭素数1~8のアルキル基(たとえば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソアミル、tert-アミル、n-ヘキシル、イソヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなど)の置換基としてはシクロアルキル(たとえば、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなど)、ハロゲン(たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど)、ヒドロキシ(保護されていてもよい)、メルカプト(保護されていてもよい)、アルコキシ(たとえば、メトキシ、エトキシなど)、アルキルチオ(たとえば、メチルチオ、エチルチオなど)、アミノ(保護されていてもよい)、置換アミノ(保護されていてもよい)、グアニジノ(保護されていてもよい)、カルボキシル(保護されていてもよい)、カルバモイル、ケトン、複素環基(炭素以外の環構成原子として窒素および/または酸素および/または硫黄を1~3個含む1~3環性の縮合複素環の炭素に結合した水素を取り除いてできる基。たとえば、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジ

ル、4-ヒドロキシシクロヘキシル、4-メトキシシクロヘキシルなどがあげられる。アラルキル基としては炭素数6~12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1~5のアルキル基が好ましく、たとえば、フェニルメチル、1-ナフチルメチル、2-フェニルエチル、2-ナフチルメチル、2-(1-ナフチル)エチル、2-(2-ナフチル)エチル、3-フェニルプロピルなどがあげられる。これらのアラルキル基は置換されていてもよく、該置換基としては低級アルキル(たとえば、メチル、エチル、n-プロピルなど)、シクロアルキル(たとえば、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなど)、ハロゲン(たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど)、ヒドロキシ(保護されていてもよい)、アルコキシ(たとえば、メトキシ、エトキシなど)があげられる。置換されたアラルキル基としてはたとえば、4-メチルフェニルメチル、2-(4-メチルフェニル)エチル、4-フルオロフェニルメチル、2-(4-クロロフェニル)エチル、2-(4-メトキシフェニル)エチルなどがあげられる。R<sub>2</sub>としてはn-プロピル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシルメチル、ペンジルが好ましく、とりわけ、イソブチルが特に好ましい。

(5)

特開平5-105698

ル、2-ピリダジニル、3-フリル、3-チエニル、2-インドリル、3-インドリル、4-チアゾリル、4-イミダゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニルなど)があげられる。置換されたアルキル基としてはたとえば、シクロヘキシルメチル、2-シクロヘキシルエチル、2-フルオロエチル、2-クロロエチル、3-クロロプロピル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、2-メトキシエチル、2-アミノエチル、4-アミノブチル、3-グアニジノプロピル、カルバモイルメチル、2-カルバモイルエチル、メルカプトメチル、カルボキシメチル、2-カルボキシエチル、4-イミダゾリルメチル、3-インドリルメチルなどがあげられる。シクロアルキル基としては5~7員環の脂環状アルキルが好ましく、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルがあげられる。これらのシクロアルキルは置換基を有していてもよく、該置換基としては低級アルキル(たとえば、メチル、エチル、n-プロピルなど)、ハロゲン(たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど)、ヒドロキシ(保護されていてもよい)、アルコキシ(たとえば、メトキシ、エトキシなど)があげられる。置換されたシクロアルキルとしてはたとえば、4-メチルシクロヘキシル、4-クロロシクロヘキシル、4-ヒドロキシシクロヘキシルなどがあげられる。アラルキル基としては炭素数6~12の芳香族炭化水素基で置換された炭素数1~5のアルキルが好ましく、たとえば、フェニルメチル、2-フェニルエチル、2-ナフチルメチル、2-(1-ナフチル)エチル、2-(2-ナフチル)エチル、3-フェニルプロピルなどがあげられる。これらのアラルキル基は置換されていてもよく、該置換基としては低級アルキル(たとえば、メチル、エチル、n-プロピルなど)、シクロアルキル(たとえば、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルなど)、ハロゲン(たとえば、フルオロ、クロロ、ブロモなど)、ヒドロキシ(保護されていてもよい)、アルコキシ(たとえば、メトキシ、エトキシなど)があげられる。置換されたアラルキル基としてはたとえば、4-メチルフェニルメチル、2-(4-メチルフェニル)エチル、4-フルオロフェニルメチル、2-(4-クロロフェニル)エチル、2-(4-メトキシフェニル)エチルなどがあげられる。R<sub>3</sub>としては置換されていてもよい3-インドリルメチル基



【0021】〔式中の記号は上記に同じ〕に保護基除去処理を行って化合物【I】を得る。【II】と【III】との反応と同時に保護基も除去されて、保護基除去処理を行うことなく化合物【I】が得られる場合もある。有機リ

ン化合物が好ましい。

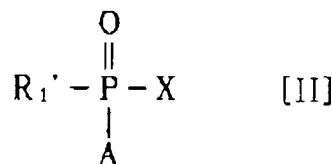
【0013】本発明の化合物【I】のR<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>が結合している炭素原子はいずれも不斉炭素であるが、本発明はそれらの炭素原子についてL体であるもの、D体であるものあるいはラセミ体であるもののすべてを包含する。

【0014】本発明の化合物【I】は塩であってもよく、そのような塩としてはアンモニウム塩、アルカリ金属塩(たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカリ土類金属塩(たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩など)、有機塩基塩(たとえば、ピリジン塩、トリエチルアミン塩など)があげられる。

【0015】本発明の化合物【I】はたとえば以下のようにして製造することができる。すなわち、式

【0016】

【化5】



【0017】で表される有機リン化合物【II】と式

【0018】

【化6】



【0019】で表されるジペプチド化合物【III】またはその塩〔両式中、Aは保護されたヒドロキシ基を、Xはハロゲン原子を、Yは保護されたカルボキシル基を、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'およびR<sub>3</sub>'はそれぞれ、置換されていてもよい炭化水素基を示し、該炭化水素基に保護する必要な基がある場合は保護基で保護されている。ただし、①R<sub>2</sub>'が無置換のメチル基である場合、②R<sub>3</sub>'が炭素数1~3の無置換の炭化水素基である場合、および、③R<sub>1</sub>'がベンジルオキシカルボニルアミノメチル基でR<sub>2</sub>'がイソブチル基であってR<sub>3</sub>'がイソブチル基もしくはフェニルメチル基である場合を除く。〕とを反応させ、得られたホスホン酸化合物【I'】

【0020】

【化7】

ン化合物【II】のAは保護されたヒドロキシ基を示す。

ここで保護基としてはP-OHの公知の保護基が用いられ、具体的には、ベンジル、4-メチルベンジルなどがあげられる。有機リン化合物【II】のXはハロゲン



(8)

特開平5-105698

5回)した。遠心上清(240×G、5分)をさらに10,000×Gで15分間遠心し、その上清を超遠心(100,000×G、90分)にかけて膜面分を沈澱として得た。この沈澱に1.0% Triton X-100を加えて酵素活性を可溶化した。可溶化した膜面分の蛋白量は約2.3gであった。これを2.0mg蛋白/mlに希釈して酵素阻害剤の検定に用いた。

【0029】2. エンドセリン変換酵素の分子量測定  
1.0% Triton X-100の代わりに1.0% 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンサルホン酸(CHAPS)を可溶化剤として用い上記と同様の処理をして得られた酵素液2.0mlを予め0.1% CHAPS、0.15M塩化ナトリウム、0.02%アジ化ナトリウム、0.1mM PMSF、1.0μg/mlロイペプチン、1.0μg/mlペプスタチンA、1.0μM E-64を添加した50mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化しておいたHiLoad 16/60 Superdex 200pg(ファルマシア社製、1.6×600mm)カラムによるゲル濾過に付した。緩衝液は平衡化と同じ緩衝液を用い流速は毎分0.5mlである。溶出液を5.0mlずつ分取して各分画のエンドセリン変換酵素活性を測定した。酵素活性の溶出位置と同一条件で分析を行った分子量校正標準蛋白との溶

表

各種蛋白分解酵素阻害剤のエンドセリン変換酵素に対する阻害効果

阻害剤	濃度(μM)	阻害率(%)
セリンプロテアーゼ阻害剤		
PMSF	1000	32
Leupeptin	100	23
Chymostatin	100	2
SHプロテアーゼ阻害剤		
E-64	100	9
SH試薬		
Dithiothreitol	96	1000
酸性プロテアーゼ阻害剤		
Pepstatin	20	100
金属プロテアーゼ阻害剤		
o-Phenanthroline	1000	92
Ethylenediamine-tetraacetic acid	1000	70
Phosphoramidone	100	70

### 3-3. 金属要求性

本酵素は金属酵素であるのでその金属要求性について調べた。酵素にo-フェナントロリン存在下で種々の金属を添加し、その活性の回復を調べた。その結果、本酵素は銅(2価)の添加では活性が回復しないが、マンガ

出位置との比較から本酵素の分子量は約300,000であると推定された。なお、クロマトグラフィーはファルマシア社のBio Pilotシステムを用いて行った。

### 【0030】3. エンドセリン変換酵素の諸性質

#### 3-1. 至適pH

ピストリス-塩酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液またはジエタノールアミン-塩酸緩衝液を用いて種々のpHで酵素活性を測定したところ本酵素はpH7.5付近に至適なpHを有していた。

#### 【0031】3-2. 各種蛋白分解酵素阻害剤に対する挙動

各種蛋白分解酵素阻害剤の本酵素に対する阻害率を表に示した。本酵素はセリンプロテアーゼ、SHプロテアーゼおよび酸性プロテアーゼのそれぞれに対する特異的酵素阻害剤によってはあまり阻害されず、金属プロテアーゼの活性を阻害する金属キレーターであるo-フェナントロリンあるいはエチレンジアミン四酢酸および金属プロテアーゼ阻害剤として知られるホスホラミドンによって阻害された。以上から本酵素は金属酵素であると結論された。なお本酵素はSH試薬によっても阻害を受けたが、ある種の金属プロテアーゼには同様の現象が認められることが知られている。

#### 【0032】

ン(2価)、亜鉛(2価)あるいはコバルト(2価)のいずれかの金属イオンの添加によって酵素活性が回復することが明かとなり、これら3種の金属のいずれかを活性中心に含んでいる可能性がある。

#### 【0033】3-4. 温度の影響



(9)

特開平5-105698

本酵素の37℃での活性は25℃の場合の3倍以上である。

#### 【0034】3-5. 速度論的係数

本酵素のブタビグエンドセリンに対するミカエリス係数はラインウィーバー・バークのプロットから約 $5 \times 10^{-6}$  M と計算された。

#### 【0035】実施例1 N-(フェネチルホスホニル)

Leu-Trp·2Na

##### 1) Boc-Leu-Trp-OBzl

Trp-OBzl·HCl (国産化学から購入) (8.39g) をN,N-ジメチルホルムアミド(200ml)に溶解し、氷冷下、トリエチルアミン(3.90ml)、Boc-Leu-ONB[Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O(6.32g), HONB(4.77g), DCC(5.49g)より調製]を加え、12時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物を酢酸エチルに溶解し、これを、水、10%クエン酸水、水、飽和炭酸水素ナトリウム水、水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去して、粗品を得た。酢酸エチル-石油エーテルより再結晶して、無色針状品のBoc-Leu-Trp-OBzl(10.3g)を得た。

【0036】融点 131-132℃, TLC Rf<sup>1</sup> 0.59

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -23.8° (C=1.04, MeOH)

元素分析 C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> として、計算値 C:68.62; H:7.35; N:8.28

実験値 C:68.46; H:7.53; N:8.30

##### 2) N-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl

1)で得たBoc-Leu-Trp-OBzl(1.20g)に、氷冷下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これをジクロロメタンに懸濁させ、氷冷下、トリエチルアミン(0.66ml)、0-ベンジル-L-フェニルホスホニル-トリセツト(E.D.Thorsett)ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 79巻, 2176頁 (1982年))に記載された方法により、ジベンジル-L-フェニルホスホニル(868mg)と五塩化リン(544mg)より調製]を加え、12時間攪拌した。反応液にジクロロメタン(50ml)を加えて希釈した後、水を加えて、10分間攪拌し、生成物をジクロロメタンで抽出した。ジクロロメタンは、10%クエン酸水、水、飽和炭酸水素ナトリウム水、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトで精製した。クロロホルムで溶出される画分より粗品を得た。酢酸エチル-石油エーテルより再結晶して、無色針状品のN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl(580mg)を得た。

【0037】融点 85-87℃, TLC Rf<sup>1</sup> 0.31

元素分析 C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:70.36; H:6.66; N:6.31

実験値 C:70.10; H:6.64; N:6.23

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>: 1740(C=O), 1660(NHC=O), 1560(Ar), 1190(P=O)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>): 0.81-0.88(6H, m), 1.27-1.37(1H, m), 1.50-1.56(1H, m), 1.60-1.70(1H, m), 1.78-1.91(1H, m), 1.93-2.00(1H, m), 2.72-2.93(3H, m), 3.25-3.30(2H, m), 3.73-3.88(1H, m), 4.71-5.10(5H, m), 6.75-7.90(22H, m)

##### 3) N-(フェニルホスホニル)-Leu-Trp·2Na

2)で得たN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl(70.0mg)、炭酸水素ナトリウム(77mg)を、メタノール-水(10:1)(11ml)に溶解し、10%パラジウム-炭素(20mg)を加え、常温、常圧の水素気流下、1.5時間、接触還元した。触媒をろ別し、ろ液を減圧下濃縮した後、水を加えて、凍結乾燥し、粉末状のN-(フェニルホスホニル)-Leu-Trp·2Na(40.3mg)を得た。

【0038】TLC Rf<sup>2</sup> 0.58

LSIMS: m/z=530.2[M+H<sup>+</sup>]

#### 実施例2 N-(フェネチルホスホニル)-Ile-Trp·2Na

##### 1) Boc-Ile-Trp-OBzl

Trp-OBzl·HCl (国産化学から購入) (8.39g) と、Boc-Ile-ONB[Boc-Ile-OH·0.5H<sub>2</sub>O(6.09g), HONB(4.77g), DCC(5.49g)より調製]とを、実施例1-1)と同様に縮合して、無色針状品のBoc-Ile-Trp-OBzl(8.02g)を得た。

【0039】融点 111-112℃, TLC Rf<sup>1</sup> 0.56

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -25.5° (C=1.05, MeOH)

元素分析 C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> として、計算値 C:68.62; H:7.35; N:8.28

実験値 C:68.50; H:7.57; N:8.23

##### 2) N-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Ile-Trp-OBzl

1)で得たBoc-Ile-Trp-OBzl(1.62g)に、氷冷下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、0-ベンジル-L-フェニルホスホニル-トリセツト[ジベンジル-L-フェニルホスホニル(1.17g)と五塩化リン(800mg)より調製]とを、実施例1-2)と同様に反応させ、無色針状品のN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Ile-Trp-OBzl(390mg)を得た。

【0040】融点 151-152℃, TLC Rf<sup>1</sup> 0.23

元素分析 C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:70.36; H:6.66; N:6.31

実験値 C:70.10; H:6.64; N:6.23

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>: 1730(C=O), 1660(NHC=O), 1540(Ar), 1200(P=O)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>): 0.79-0.88(6H, m), 0.93-1.03(1H, m), 1.33-1.42(1H, m), 1.63-1.76(1H, m), 1.79-1.93(1H, m), 1.93-2.02(1H, m), 2.55-2.91(2H, m), 2.94-3.02(1H, m), 3.19-3.22(2H, m), 3.59-3.67(1H, m), 4.73-5.11(5H, m), 6.51-7.87(22H, m)

(10)

特開平5-105698

3)N-(フェニルホスホニル)-Ile-Trp·2Na

2)で得たN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Ile-Trp-OBzl(70.0mg)を実施例1-3)と同様に接触還元して、粉末状のN-(フェニルホスホニル)-Ile-Trp·2Na(45.8mg)を得た。

【0041】TLC Rf<sup>2</sup> 0.58

LSIMS:m/z=530.2[M+H<sup>+</sup>]

実施例3 N-(フェニルホスホニル)-Val-Trp·2Na

1)Boc-Val-Trp-OBzl

Trp-OBzl·HCl(国産化学から購入)(5.00g)と、Boc-Val-ONB[Boc-Val-OH(3.28g),HONB(2.84g),DCC(3.27g)より調製]とを、実施例1-1)と同様に縮合して、無色針状品のBoc-Val-Trp-OBzl(4.88g)を得た。

【0042】融点 139-140°C, TLC Rf<sup>2</sup> 0.44

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -21.8° (C=1.04, MeOH)

元素分析 C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>として、計算値 C:68.13;

H:7.15; N:8.51

実験値 C:68.13; H:7.08; N:8.51

2)N-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Val-Trp-OBzl

1)で得たBoc-Val-Trp-OBzl(1.58g)に、氷冷下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間撹拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、0-ベンジル-L-フェニルホスホニルトリブチルアンモニウム(1.17g)と五塩化リン(800mg)より調製]とを、実施例1-2)と同様に反応させ、無色針状品のN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Val-Trp-OBzl(337mg)を得た。

【0043】融点 143-144°C, TLC Rf<sup>1</sup> 0.23

元素分析 C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P·0.25H<sub>2</sub>Oとして、計算値 C:69.55; H:6.52; N:6.40

実験値 C:69.53; H:6.78; N:6.31

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>: 1740(C=O), 1660(NHC=O), 1550(Ar), 1200(P=O)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>) 0.78-0.83(3H, m), 0.87-0.92(3H, m), 1.83-2.06(3H, m), 2.76-2.93(2H, m), 2.99-3.10(1H, m), 3.19-3.32(2H, m), 3.56-3.66(1H, m), 4.22-5.60(5H, m), 6.55-7.91(22H, m)

3)N-(フェニルホスホニル)-Val-Trp·2Na

2)で得たN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Val-Trp-OBzl(70.0mg)を実施例1-3)と同様に接触還元して、粉末状のN-(フェニルホスホニル)-Val-Trp·2Na(40.3mg)を得た。

【0044】TLC Rf<sup>2</sup> 0.58

LSIMS:m/z=516.1[M+H<sup>+</sup>]

実施例4 N-(フェニルホスホニル)-Phe-Trp·2Na

1)Boc-Phe-Trp-OBzl

Trp-OBzl·HCl(国産化学から購入)(5.00g)と、Boc-Phe-ONB[Boc-Phe-OH(4.01g),HONB(2.84g),DCC(3.27g)より調製]とを、実施例1-1)と同様に縮合して、無色針状品の

のBoc-Phe-Trp-OBzl(7.98g)を得た。

【0045】融点 129-130°C, TLC Rf<sup>1</sup> 0.48

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -4.1° (C=1.04, MeOH)

元素分析 C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>として、計算値 C:70.96;

H:6.51; N:7.76

実験値 C:70.70; H:6.72; N:7.53

2)N-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Phe-Trp-OBzl

1)で得たBoc-Phe-Trp-OBzl(1.73g)に、氷冷下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間撹拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、0-ベンジル-L-フェニルホスホニルトリブチルアンモニウム(1.17g)と五塩化リン(800mg)より調製]とを、実施例1-2)と同様に反応させ、無色針状品のN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Phe-Trp-OBzl(452mg)を得た。

【0046】融点 54-55°C, TLC Rf<sup>1</sup> 0.30

元素分析 C<sub>42</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Pとして、計算値 C:72.09; H:6.05; N:6.00

実験値 C:69.71; H:6.42; N:5.75

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>: 1740(C=O), 1660(NHC=O), 1500(Ar), 1200(P=O)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>) 1.45-1.68(2H, m), 2.50-2.66(2H, m), 2.72-3.03(3H, m), 3.12-3.30(2H, m), 4.01-4.15(1H, m), 4.36-4.64(1H, m), 4.75-4.83(1H, m), 4.41-5.09(3H, m), 6.60-7.87(2H, m)

3)N-(フェニルホスホニル)-Phe-Trp·2Na

2)で得たN-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Phe-Trp-OBzl(70mg)を実施例1-3)と同様に接触還元して、粉末状のN-(フェニルホスホニル)-Phe-Trp·2Na(45.0mg)を得た。

【0047】TLC Rf<sup>2</sup> 0.58

LSIMS:m/z=564.1[M+H<sup>+</sup>]

実施例5 N-(フェニルホスホニル)-Cha-Trp·2Na

1)Boc-Cha-Trp-OBzl

Trp-OBzl·HCl(国産化学から購入)(1.65g)と、Boc-Cha-ONB[Boc-Cha-OH·DCHA(Nova biochemから購入)(2.26g),HONB(941mg),DCC(1.08g)より調製]とを、実施例1-1)と同様に縮合して、無色針状品のBoc-Cha-Trp-OBzl(2.12g)を得た。

【0048】融点 67-68°C, TLC Rf<sup>1</sup> 0.70

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -14.9° (C=1.02, MeOH)

元素分析 C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>として、計算値 C:70.18;

H:7.55; N:7.67

実験値 C:70.23; H:7.84; N:7.38

2)N-(0-ベンジル-L-フェニルホスホニル)-Cha-Trp-OBzl

1)で得たBoc-Cha-Trp-OBzl(1.75g)に、氷冷下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間撹拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶を

(11)

時間平5 105698

ろ取し、乾燥した。これと、O-ベンジリル-L-フェニルアラニン塩酸塩(1.17g)と五塩化リン(800mg)より調製]とを、実施例1-2)と同様に反応させ、無色針状晶のN-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Cha-Trp-OBzl(410mg)を得た。

【0049】融点 107-109℃, TLC Rf<sup>1</sup> 0.28

元素分析 C<sub>42</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:71.47; H:6.85; N:5.95

実験値 C:71.38; H:6.93; N:5.58

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>:1750(C=O),1660(NHC=O),1500(Ar),1200(P=O)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>)0.76-0.93(2H,m),1.04-1.21(3H,m),1.26-1.41(2H,m),1.53-1.73(6H,m),1.84-2.01(2H,m),2.71-2.91(3H,m),3.24-3.31(2H,m),3.78-3.87(1H,m),4.70-5.11(5H,m),6.71-7.96(22H,m)

3)N-(フェニルアラニン)-Cha-Trp·2Na

2)で得たN-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Cha-Trp-OBzl(70.6mg)を実施例1-3)と同様に接触還元して、粉末状のN-(フェニルアラニン)-Cha-Trp·2Na(38.4mg)を得た。

【0050】TLC Rf<sup>2</sup> 0.58

LSIMS:m/z=570.2[M+H<sup>+</sup>]

実施例6 N-(フェニルアラニン)-Nle-Trp·2Na

1)Boc-Nle-Trp-OBzl

Trp-OBzl·HCl(国産化学から購入)(1.65g)と、Boc-Nle-ONB[Boc-Nle-OH·DCHA(Nova biochemから購入)(2.06g),HONB(941mg),DCC(1.08g)より調製]とを、実施例1-1)と同様に縮合して、淡黄色油状物のBoc-Nle-Trp-OBzl(2.41g)を得た。

TLC Rf<sup>1</sup> 0.55

LSIMS:m/z=508.2(M<sup>+</sup>)

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>:1680(NHC=O),1510(Ar)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>)0.83(3H,t),1.18-1.31(4H,m),1.41(9H,s),1.65-1.80(2H,m),3.25-3.35(2H,m),4.04(1H,broad,s),4.40-4.99(2H,m),5.07(2H,s),6.50-6.55(1H,m),6.84-7.51(10H,m),8.13(1H,broad,s)

2)N-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Nle-Trp-OBzl

1)で得たBoc-Nle-Trp-OBzl(1.62g)に、氷冷下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間撹拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、O-ベンジリル-L-フェニルアラニン塩酸塩(1.17g)と五塩化リン(800mg)より調製]とを、実施例1-2)と同様に反応させ、無色油状物のN-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Nle-Trp-OBzl(150mg)を得た。

【0051】TLC Rf<sup>1</sup> 0.27

LSIMS:m/z=666.3(M<sup>+</sup>)

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>:1740(C=O),1660(NHC=O),1500(Ar),1190(P=O)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>)0.80-0.87(3H,m),1.16-1.28(4H,m),1.41-1.83(2H,m),1.83-2.01(2H,m),2.74-2.90(3H,m),3.25-3.30(2H,m),3.67-3.79(1H,m),4.73-5.13(5H,m),6.66-7.85(22H,m)

3)N-(フェニルアラニン)-Nle-Trp·2Na

2)で得たN-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Nle-Trp-OBzl(31.0mg)を実施例1-3)と同様に接触還元して、粉末状のN-(フェニルアラニン)-Nle-Trp·2Na(13.3mg)を得た。

【0052】TLC Rf<sup>2</sup> 0.58

LSIMS:m/z=530.2[M+H<sup>+</sup>]

実施例7 N-(フェニルアラニン)-Leu-Trp·2Na

1)Boc-Leu-Phe-OBzl

Phe-OBzl·Tos(ペプチド研究所より購入)(7.27g)と、Boc-Leu-ONB[Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O(3.93g),HONB(3.20g),DCC(3.68g)より調製]とを、実施例1-1)と同様に縮合して、無色針状晶のBoc-Leu-Phe-OBzl(5.64g)を得た。

【0053】融点 100-101℃, TLC Rf<sup>1</sup> 0.66

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -35.3°(C=1.04,MeOH)

元素分析 C<sub>37</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> として、計算値 C:69.21;

H:7.74; N:5.98

実験値 C:69.42; H:7.70; N:6.05

2)N-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Leu-Phe-OBzl

1)で得たBoc-Leu-Phe-OBzl(1.50g)に、氷冷下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間撹拌する。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、O-ベンジリル-L-フェニルアラニン塩酸塩(1.17g)と五塩化リン(800mg)より調製]とを、実施例1-2)と同様に反応させ、無色針状晶のN-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Leu-Phe-OBzl(351mg)を得た。

【0054】融点 93-95℃, TLC Rf<sup>1</sup> 0.37

元素分析 C<sub>37</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:70.91; H:6.92; N:4.47

実験値 C:70.64; H:7.04; N:4.30

IR ν<sub>max</sub>(KBr)cm<sup>-1</sup>:1750(C=O),1660(NHC=O),1500(Ar),1190(P=O)

NMR δ ppm(CDCl<sub>3</sub>)0.85-0.90(6H,m),1.23-1.37(1H,m),1.48-1.56(1H,m),1.59-1.69(1H,m),1.92-2.06(1H,m),2.26-2.95(3H,m),3.01-3.13(2H,m),3.73-3.81(1H,m),4.87-5.16(5H,m),6.69-7.37(21H,m)

3)N-(フェニルアラニン)-Leu-Phe·2Na

2)で得たN-(O-ベンジリル-L-フェニルアラニン)-Leu-Phe-OBzl(70.0mg)を実施例1-3)と同様に接触還元して、粉末状のN-(フェニルアラニン)-Leu-Phe·2Na(52.4mg)を得た。

【0055】TLC Rf<sup>2</sup> 0.58

LSIMS:m/z=491.1[M+H<sup>+</sup>]

実施例8 N-(フェニルアラニン)-Leu-Trp·2Na

## 1) Boc-Leu-Leu-OBzl

Leu-OBzl·Tos (ペプチド研究所より購入) (6.69g) と、Boc-Leu-ONB[Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O (3.93g), HONB (3.20g), DCC (3.68g) より調製] とを、実施例 1-1) と同様に縮合して、無色針状品の Boc-Leu-Leu-OBzl (5.67g) を得た。

【0056】融点 90-91°C, TLC R<sub>f</sub><sup>1</sup> 0.94

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -51.0° (C=1.00, MeOH)

元素分析 C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> として、計算値 C:66.33;

H:8.81; N:6.45

実験値 C:66.29; H:8.78; N:6.48

## 2) N-(0-ヘンジル-L-フェニルアラニン)-Leu-Leu-OBzl

1) で得た Boc-Leu-Leu-OBzl (1.39g) に、氷冷下、1,2-エタンジチオール (0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン (20ml) を加えて溶解し、30分間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、0-ヘンジル-L-フェニルアラニンクロライド [ジ・ヘンジル-L-フェニルアラニン (1.17g) と五塩化リン (800mg) より調製] とを、実施例 1-2) と同様に反応させ、無色針状品の N-(0-ヘンジル-L-フェニルアラニン)-Leu-Leu-OBzl (385mg) を得た。

【0057】融点 141-143°C, TLC R<sub>f</sub><sup>1</sup> 0.52

元素分析 C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:68.90; H:7.65; N:4.73

実験値 C:68.64; H:7.76; N:4.50

IR ν<sub>max</sub>(KBr) cm<sup>-1</sup>: 1750 (C=O), 1660 (NHC=O), 1500 (Ar), 1200 (P=O)

NMR δ ppm (CDCl<sub>3</sub>) 0.81-0.95 (12H, m), 1.36-1.76 (6H, m), 2.00-2.14 (2H, m), 2.83-3.14 (3H, m), 4.80-4.90 (1H, m), 4.60-4.66 (1H, m), 4.86-5.16 (4H, m), 6.75-7.39 (16H, m)

## 3) N-(フェニルアラニン)-Leu-Leu-2Na

2) で得た N-(0-ヘンジル-L-フェニルアラニン)-Leu-Leu-OBzl (70.0mg) を実施例 1-3) と同様に接触還元して、粉末状の N-(フェニルアラニン)-Leu-Leu-2Na (51.0mg) を得た。

【0058】TLC R<sub>f</sub><sup>2</sup> 0.58

LSIMS: m/z=457.1 [M+H<sup>+</sup>]

実施例 9 N-(イソアミルホスホニル)-Leu-Trp·2Na

## 1) N-(0-ヘンジル-L-イソアミルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl

実施例 1-1) で得た Boc-Leu-Trp-OBzl (1.20g) に、氷冷下、1,2-エタンジチオール (0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン (20ml) を加えて溶解し、30分間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、0-ヘンジル-L-イソアミルホスホニルクロライド [トーセット (E. D. Thorsett) ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 79 巻, 2176 頁 (1982年) に記載された方法により、ジ・ヘンジル-L-イソアミルホスホニル (788mg) と五塩化リン (544mg) より調製] とを、実施例 1-2) と同様に反応させ、無色針状品の N-(0-ヘンジル-L-イソアミルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl (253mg) を

得た。

【0059】融点 78-80°C, TLC R<sub>f</sub><sup>1</sup> 0.30

元素分析 C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:68.44; H:7.34; N:6.65

実験値 C:68.23; H:7.10; N:6.61

IR ν<sub>max</sub>(KBr) cm<sup>-1</sup>: 1730 (C=O), 1660 (NHC=O), 1530 (Ar), 1200 (P=O)

NMR δ ppm (CDCl<sub>3</sub>) 0.80-0.87 (12H, m), 1.31-1.70 (8H, m), 2.73-2.86 (1H, m), 3.23-3.35 (2H, m), 3.71-3.82 (1H, m), 4.65-5.11 (5H, m), 6.76-8.13 (17H, m)

## 2) N-(イソアミルホスホニル)-Leu-Trp·2Na

1) で得た N-(0-ヘンジル-L-イソアミルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl (70.0mg) を実施例 1-3) と同様に接触還元して、粉末状の N-(イソアミルホスホニル)-Leu-Trp·2Na (54.0mg) を得た。

【0060】TLC R<sub>f</sub><sup>2</sup> 0.58

LSIMS: m/z=496.1 [M+H<sup>+</sup>]

実施例 10 N-(シクロヘキシルメチルホスホニル)-Leu-Trp·2Na

## 1) N-(0-ヘンジル-L-シクロヘキシルメチルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl

実施例 1-1) で得た Boc-Leu-Trp-OBzl (1.20g) に、氷冷下、1,2-エタンジチオール (0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン (20ml) を加えて溶解し、30分間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶をろ取し、乾燥した。これと、0-ヘンジル-L-シクロヘキシルメチルホスホニルクロライド [トーセット (E. D. Thorsett) ら、プロシーディングス・オブ・アカデミー・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 79 巻, 2176 頁 (1982年) に記載された方法により、ジ・ヘンジル-L-シクロヘキシルメチルホスホニル (1.10g) と五塩化リン (767mg) より調製] とを、実施例 1-2) と同様に反応させ、無色針状品の N-(0-ヘンジル-L-シクロヘキシルメチルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl (360mg) を得た。

融点 99-101°C, TLC R<sub>f</sub><sup>1</sup> 0.32

元素分析 C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:69.39; H:7.36; N:6.39

実験値 C:69.13; H:7.42; N:6.31

IR ν<sub>max</sub>(KBr) cm<sup>-1</sup>: 1740 (C=O), 1660 (NHC=O), 1560 (Ar), 1200 (P=O)

NMR δ ppm (CDCl<sub>3</sub>) 0.81-0.88 (6H, m), 0.88-1.99 (16H, m), 2.92-3.05 (1H, m), 3.22-3.35 (2H, m), 3.70-3.80 (1H, m), 4.66-5.10 (5H, m), 6.35-8.31 (17H, m)

## 2) N-(シクロヘキシルメチルホスホニル)-Leu-Trp·2Na

1) で得た N-(0-ヘンジル-L-シクロヘキシルメチルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl (70.0mg) を実施例 1-3) と同様に接触還元して、粉末状の N-(シクロヘキシルメチルホスホニル)-Leu-Trp·2Na (48.1mg) を得た。

【0061】TLC R<sub>f</sub><sup>2</sup> 0.58

LSIMS: m/z=522.2 [M+H<sup>+</sup>]

実施例 11 N-(1-ナフチルメチルホスホニル)-Leu-Trp·2Na

## 1) N-(0-ヘンジル-L-(1-ナフチル)メチルホスホニル)-Leu-Trp-OBzl

実施例 1-1) で得た Boc-Leu-Trp-OBzl (1.64g) に、氷冷



(14)

特開平5-105698

下、1,2-エタンジチオール(0.2ml)、8N-塩酸-ジオキサン(20ml)を加えて溶解し、30分間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残留物にジエチルエーテルを加え、析出した結晶を取り、乾燥した。これと、O-ベンジル-L-P-[2-(2-ナフチル)]エチルホスホネート[トーセツト(E.D.Thorset)ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 79巻, 2176頁(1982年)に記載された方法により、O-ベンジル-L-2-(2-ナフチル)エチルホスホネート(1.65g)と五塩化リン(1.07g)より調製]とを、実施例1-2と同様に反応させ、無色針状晶のN-[O-ベンジル-L-P-[2-(2-ナフチル)]エチルホスホネート]-Leu-Trp-OBzl(850mg)を得た。

【0068】融点 51.5-53.0°C, TLC Rf 0.40  
元素分析 C<sub>43</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P として、計算値 C:72.15; H:6.48; N:5.87

実験値 C:72.05; H:6.42; N:5.79  
IR  $\nu_{\max}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 1740(C=O), 1660(NHC=O), 1510(Ar), 1200(P=O)  
NMR  $\delta$  ppm(CDCl<sub>3</sub>): 0.80-0.88(6H, m), 1.25-1.37(1H, m), 1.50-1.56(1H, m), 1.56-1.70(1H, m), 1.91-2.00(1H, m), 2.00-2.10(1H, m), 2.68-2.81(1H, m), 2.89-3.06(2H, m), 3.26-3.30(2H, m), 3.73-3.84(1H, m), 4.72-5.10(5H, m), 6.65-7.84(24H, m)  
2) N-[2-(2-ナフチル)エチルホスホネート]-Leu-Trp·2Na  
1)で得たN-[O-ベンジル-L-P-[2-(2-ナフチル)]エチルホスホネート]-Leu-Trp-OBzl(50.0mg)を実施例1-3と同様に接触還元して、粉末状のN-[2-(2-ナフチル)エチルホスホネート]-Leu-Trp·2Na(26.1mg)を得た。  
【0069】TLC Rf 0.66  
LSIMS: m/z = 580.1 [M+H<sup>+</sup>]